Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Richard-Ernst Bader

Adaptation von Influenza-A_2-Viren an die neugeborene Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Elme Baur
aus Freudenstadt

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0130

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Richard-Ernst Bader

Adaptation von Influenza-A_2-Viren an die neugeborene Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Elme Baur
aus Freudenstadt

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H.-J. Gerth

(Professor Dr. R.-E. Bader)

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. J. Knüttgen

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Inhaltsverzeichnis

I. Einführung Seite 3

II. Material und Methodik Seite 5

III. Ergebnisse

1. Adaptation Seite 9

2. Vermehrung von Viren in der Lunge Seite 13

3. Überlebenszeiten Seite 32

IV. Besprechung Seite 41

V. Zusammenfassung Seite 48

Literaturverzeichnis Seite 49

I. Einführung

Der Verlauf einer Virusinfektion hängt von der Art und Virulenz des Erregers und vom Zustand des infizierten Organismus ab. Hierbei spielt neben dem Immunstatus das Alter eine wichtige Rolle. Während z.B. die Influenzaepidemie von 1918/19 bevorzugt und besonders schwer die Zwanzig- bis Vierzigjährigen betroffen hat, ist von allen anderen Influenzaepidemien bekannt, daß Kleinkinder und Greise besonders schwer erkrankten. (FENNER 1968) Coxsackie-B-Infektionen, die bei Mensch und Tier im Erwachsenenalter relativ harmlos verlaufen, können beim Neugeborenen schwerste Encephalomyocarditiden hervorrufen. (KIBRICK 1961)
Die unterschiedliche Empfindlichkeit scheint durch eine ganze Reihe von Faktoren bedingt zu sein.
Der Einfluß des Alters auf die Antikörper- und Interferonproduktion, auf das Ausmaß der Viraemie, auf das Rezeptorensystem der Zellen wurde in zahlreichen Tierexperimenten untersucht.

In vorliegender Arbeit wurde versucht, einige Substämme von Influenza-A_2-Viren speziell an die neugeborene Maus zu adaptieren.
Die auf diese Weise gewonnenen Stämme wurden verglichen mit solchen, die an den Hühnerembryo (Brutei) und mit solchen, die an die erwachsene Maus adaptiert waren.
Dazu wurden die Wechselwirkungen zwischen den altersspezifisch adaptierten Virusstämmen und dem Wirt verschiedenen Alters beobachtet. Es wurde gemessen, wie schnell sich die Viren in der Lunge vermehren, welche Konzentrationen sie zu erlangen vermögen und was sie dabei für Infektionsauswirkungen hervorrufen.

Influenza-A-Viren sind für solche Versuche besonders geeignet, denn sie besitzen eine große Anpassungsfähigkeit. Diese Variabilität ist in dem besonderen Aufbau ihrer Proteinhülle begründet. Sie manifestiert sich in der Morphologie, der Neuraminidaseaktivität, dem Antigenaufbau und der Affinität zu bestimmten Mukoproteinen.
In weiterführenden Versuchen müßten diese Eigenschaften bei verschieden adaptierten Stämmen untersucht und verglichen werden.

II. Material und Methodik

Virus: Als Ausgangsmaterial für die Adaptation dienten Stämme mit 9 bis 13 Eipassagen:

Infl. A2/RI5/57^{+}(E_{11}*)
Infl. A2/RI5/57^{-}(E_{13})
Infl. A2/Tübingen/63^{-}(E_{10})
Infl. A2/AA1/65^{+}(E_{9})

In Kreuzversuchen miteinander verglichen wurden folgende Stämme:

1. Infl. A2/RI5/57^{+}(E_{18}) und ($E_{11}BM_{27}$**E_{1}) und Infl. A2/AA/63^{+} ($E_{13}BM_{12}M_{17}$***ET_{2}****)
2. Infl. A2/Tübingen/63^{-}(E_{11}) und ($E_{10}BM_{35}E_{1}$) und ($E_{9}BM_{10}M_{25}ET_{1}E_{6}$)
3. Infl. A2/AA1/65^{+}(E_{17}) und ($E_{9}BM_{29}E_{1}$) und ($E_{9}BM_{10}M_{2}ET_{1}M_{15}ET_{3}E_{1}$)

Die Empfindlichkeit gegenüber Pferdeseruminhibitoren ist bei mit + bezeichneten Stämmen hoch, bei mit - gekennzeichneten Stämmen gering.
Die Stämme stammten aus der Sammlung des Hygiene-Instituts. Ihre Eigenschaften wurden im einzelnen beschrieben (GERTH, Habilitationsschrift 1968).

Da die Adaptation an die erwachsene Maus oft Schwierigkeiten macht, wurden alle Stämme zuerst über neugeborene Mäuse verimpft.

---

* E = Passage in der Allantoishöhle des bebrüteten Hühnereies

** BM = Passage in der Lunge der neugeborenen Maus

*** M = Passage in der Lunge der erwachsenen Maus

**** ET = Titration im bebrüteten Hühnerei (Die höchste positive Verdünnungsstufe wurde weiter verimpft)

Mäuse: Für die Adaptation wurden NMRI-Mäuse aus der Zucht des Hygiene-Instituts, für die Vermehrungskurven und Überlebenszeitbestimmungen NMRI-Mäuse von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, verwendet.

Puffer: Es wurde phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH = 7,2 verwendet. Bei Impfmaterialien wurde zu 100 ml Puffer 0,5 ml Antibiotikalösung (500 IE Penicillin und 500 γ Streptomycin/ml) gegeben.

Pferdeserum: Pferdeblut wurde uns von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, zur Verfügung gestellt. Das Serum wurde im Wasserbad 30 Minuten bei 56^0 inaktiviert.

Hämagglutinationsreaktion: Die Gewinnung und Verarbeitung der Hühnererythrocyten, ebenso wie die Durchführung der Hämagglutination entsprach der von GERTH (1968) angegebenen und richtete sich nach den Empfehlungen des "Committee on Standard Serological Procedures in Influenza Studies" (1950).
Als Hämagglutinationstiter einer virushaltigen Flüssigkeit wurde der reziproke Wert der höchsten Verdünnungsstufe angegeben, die in der Lage war, noch eine vollständige Hämagglutination zu bewirken.
Um Hämagglutinationstiter ohne vorherige Eipassage direkt von Lungenmaterial zu bekommen, wurde die Lunge in 2 ml antibiotikahaltigem Puffer zermörsert, bei 3 000 U/min 25 min zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugats wurde mit gleichen Teilen Trypsin versetzt, 20 min bei 37^0 im Wasserbad erwärmt und danach 10 min in das Gefrierfach des Kühlschranks gestellt. Anschließend wurde sofort die Hämagglutination durchgeführt.

Titration im Brutei: Die virushaltige Flüssigkeit wurde in Zehner-Schritten verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 0,2 ml in die Allantoishöhle von 4 zehn Tage bebrüteten Hühnereiern geimpft. Nach 48 Stunden weiterer Bebrütung wurden die Eier über Nacht kalt gelegt. Dann wurden die Eiflüssigkeiten einzeln geerntet und ihre Hämagglutinationstiter bestimmt. Die EID_{50} wurde nach der Methode von KÄRBER (1931) berechnet.

Adaptation: Mindestens sieben neugeborene Mäuse wurden mit drei Tropfen einer Virussuspension intranasal geimpft. Nach drei Tagen wurden die Mäuse seziert. Das Ausmaß der Lungenläsionen wurde nach GINSBERG (1952) als 0+ bezeichnet, wenn keine sichtbaren Läsionen vorhanden waren, für den Befall von etwa 1/4, 1/2, 3/4 oder der ganzen Lunge wurde 1+, 2+, 3+ und 4+ notiert. 5+ bedeutet, daß die Läsionen tödlich waren. Die Lungenläsionen einer Passagegruppe wurden ausgedrückt als Prozentsatz der höchstmöglichen Läsionen. Danach wurden die Lungen in 2 ml antibiotikahaltigem Puffer zermörsert und anschließend 30 min bei 3 000 U/min zentrifugiert. Sofort oder nach ein bis drei Tagen Lagerung im Kühlschrank wurde der Überstand weiterverimpft.
Um auch bei fehlenden Lungenläsionen Klarheit über die Anwesenheit von Virus zu bekommen, wurden parallel zu jeder 2. Lungenpassage Eipassagen durchgeführt. Bei verdächtig frühen oder starken Erkrankungen der Mäuse wurden bakterielle Infektionen durch Ausstriche auf Blutagarplatten ausgeschlossen.

Vermehrungskurven: Als Impfmaterial dienten Eiflüssigkeiten mit bekannter EID_{50}, die in 1 ml-Portionen bei -70^{0} gelagert wurden. Sofort nach dem Auftauen wurden

diese durch Verdünnung mit Puffer auf 10^4 EID_{50}/ml eingestellt und verimpft. 30 erwachsene, etwa 20 g schwere Mäuse wurden leicht mit Äther anaesthesiert und mit je drei Tropfen intranasal geimpft. 30 null Tage alte Mäuse, das waren drei Würfe, atmeten je einen Tropfen derselben Flüssigkeit ein. Nach 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden sechs Mäuse jeder Gruppe mit Chloroform getötet. Die Lungen wurden steril präpariert, die Läsionen von 0+ bis 4+ geschätzt. Die Lungen aller sechs Tiere wurden mit 2 ml antibiotikahaltigem Puffer zermörsert, 25 min bei 3 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei Portionen auf -70° tiefgefroren. Von diesen wurden später EID_{50}-Werte und Hämagglutinationstiter bestimmt.

Überlebenszeiten: Ausgangsmaterialien und Impftechnik waren dieselben wie bei den Vermehrungskurven. Die virushaltige Eiflüssigkeit wurde in Zehner-Schritten verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden sechs erwachsene 20 g schwere Mäuse und zehn neugeborene Mäuse intranasal geimpft. Täglich wurden die lebenden Tiere registriert und die toten entfernt.
Am 10. Tag wurden die Überlebenden Tiere seziert und die Lungenläsionen als 0+ bis 4+ notiert.
Das harmonische Mittel wurde nach CAVALLI-SFORZA (1969) berechnet.

III. Ergebnisse

1. Adaptation

Der Versuch wurde mit folgenden Substämmen von Infl. A2-Viren durchgeführt: RI5/57$^-$, RI5/57$^+$, Tübingen/63$^-$, AA1/65$^+$.
Mit jedem der vier Stämme wurde ein Wurf neugeborener Mause intranasal geimpft. Bei der Sektion nach drei Tagen waren makroskopisch nur geringe Lungenläsionen feststellbar. Erst nach weiteren Passagen konnten ausgedehnte Läsionen erzielt werden.
In Abb. 1 ist die Zunahme der sichtbaren Lungenläsionen im Verlauf der Adaptation von RI5/57$^+$ und RI5/57$^-$ an die neugeborene Maus dargestellt.

Tab. 1 zeigt die Änderungen im Ausmaß der Lungenläsionen, die während der Adaptation bei allen vier Stämmen auftraten. Abgesehen von einzelnen Unregelmäßigkeiten, die minimale Läsionen anzeigen und wohl von Interferenz herrühren, ist bei den Stämmen RI5/57$^+$, RI5/57$^-$ und Tübingen/63$^-$ eine stetige Zunahme ersichtlich. Ab der 15./16. Passage betrugen die Läsionen immer mehr als 50 %. Bei Beendigung der Passagen riefen diese drei Stamme Lungenläsionen von mehr als 70 % hervor. Der Stamm AA1/65$^+$ dagegen zeigte von Anfang an Lungenlasionen, die sich von Passage zu Passage sprunghaft änderten. Auch bei mehr als 20 Passagen mußte mit einer Differenz von 30 bis 40 % gerechnet werden.
Im Verlauf der Adaptation wurde bei RI5/57$^+$ und bei AA1/65$^+$ eine Abnahme der Empfindlichkeit

gegenüber Pferdeseruminhibitoren festgestellt.

Der RI5/57^{+}-Stamm wurde ab der 18. Passage nicht mehr vollständig durch Pferdeserum gehemmt. Mit 1%igem Pferdeserum durchgeführte Hämagglutinationen ergaben in den folgenden Passagen Titer, die zwischen 5 und 160 schwankten.
Beim AA1/65^{+}-Stamm konnte die geringere Empfindlichkeit ab der 26. Passage nachgewiesen werden.
Die Pferdeserum-Hämagglutinationstiter in den weiteren Passagen lagen in der Größenordnung zwischen 20 und 80.
Die ohne Pferdeserum ausgeführten Hämagglutinationen ergaben im gleichen Zeitraum bei beiden Stämmen Titer zwischen 40 und 1280.

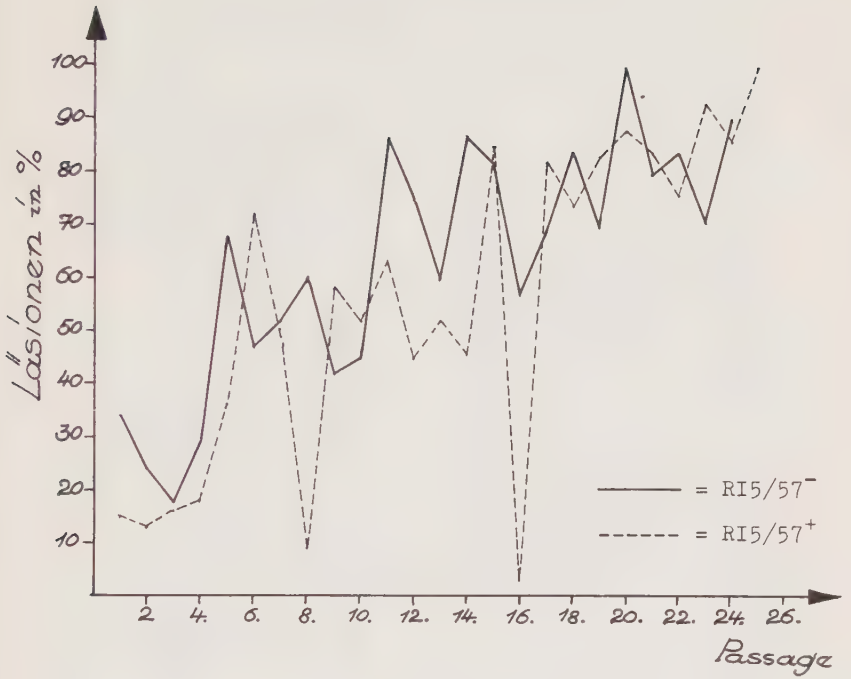

Abb. 1: Lungenläsionen bei fortlaufenden Passagen auf neugeborenen Mäusen.

Stamm	RI5/57^{+}	RI5/57^{-}	Tübingen/63^{-}	AA1/65^{+}
Anzahl d.Passagen	Lungenläsionen in % der maximal möglichen Läsionen			
1	15	34		
2	13	24		
3	16	18	Die Stämme wurden erst	
4	18	29	in der 11. bzw. 13.	
5	36	68	Passage übernommen.	
6	72	47	Die Läsionen lassen	
7	49	52	sich nicht vergleichen,	
8	9	60	da sie auf andere Art	
9	58	42	festgestellt wurden.	
10	52	45		
11	63	86		
12	45	75	33	
13	52	60	57	
14	46	87	43	0
15	85	82	50	32
16	3	57	14	32
17	82	69	82	57
18	* 74	84	71	65
19	83	70	65	75
20	88	100	90	43
21	84	80	83	62
22	76	84	20	32
23	93	71	57	77
24	86	90	57	72
25	100		57	94
26			57	* 47
27			72	85
28			80	53
29			88	100
30			89	
31			80	
32			83	
33			100	
34			100	
35			92	

Tab. 1: Adaptation an die neugeborene Maus.
Veränderungen im Ausmaß der Lungenläsionen mit der steigenden Anzahl der Passagen.

* = ab dieser Passage wurden die Stämme nicht mehr vollständig durch Pferdeserum gehemmt.

2. Vermehrung von Viren in der Lunge

In drei aufeinanderfolgenden Versuchen, unter jeweils gleichen Bedingungen, mit der unter II. beschriebenen Methodik wurde die Vermehrungsgeschwindigkeit folgender Substämme von Infl. A2-Viren in der Lunge von erwachsenen und neugeborenen Mäusen untersucht:

1.) Tübingen/63$^-$:

E_{11}	bezeichnet als Ei-Stamm
$E_{10}BM_{35}E_1$	bezeichnet als BM-Stamm
$E_9BM_{10}M_{25}ET_1E_6$	bezeichnet als M-Stamm

2.) AA1/65$^+$:

E_{17}	bezeichnet als Ei-Stamm
$E_9BM_{29}E_1$	bezeichnet als BM-Stamm
$E_9BM_{10}M_2ET_1M_{15}ET_3E_1$	bezeichnet als M-Stamm

3.) RI5/57$^+$:

E_{18}	bezeichnet als Ei-Stamm
$E_{11}BM_{27}E_1$	bezeichnet als BM-Stamm

Da uns bei diesem Stamm keine Adaptation an die erwachsene Maus gelungen ist, wurde zum Vergleich herangezogen:

AA/63$^+$:

$E_{13}BM_{12}M_{17}ET_2$	bezeichnet als M-Stamm

a.) EID_{50}-Werte

Die Quantität der in der Lunge vorhandenen Viren wurde als ID_{50} im Brutei ermittelt. Die Werte bei neugeborenen und erwachsenen Mäusen lassen sich nicht unmittelbar vergleichen. Die Lungen der sechs Neugeborenen wogen etwa 0,2 g, die der sechs Erwachsenen etwa 1,2 g. Da das Material jeweils in 2 ml Puffer aufgearbeitet wurde, ergibt sich für die Neugeborenen-Lungen eine sechsfach höhere Verdünnung.
Bei der Eititration wurden pro Verdünnungsstufe vier Eier geimpft. Der Verdünnungsfaktor betrug 1 : 10. Nach LORENZ (1960) ist bei einer solcherweise durchgeführten Virustitration die Signifikanzschwelle für die Unterschiede zweier -log ID_{50} = 0,996. Dabei wurde ein Pipettierfehler von 5 % mit eingerechnet. Demnach liegen Titerdifferenzen von weniger als 1 nicht mehr im Bereich der Signifikanz. Die Titer werden im folgenden in EID_{50}-Werten angegeben.

Abb. 2 zeigt die Virusvermehrung bei den Tübingen/63$^-$-Varianten.
Abb. 2a: Der BM-Stamm erreichte in der Lunge der neugeborenen Maus schon nach 12 Stunden (0,5. Tag) eine Titerhöhe von 10^7. In den folgenden zwei Tagen stieg der Titer bis $10^{8,5}$ an. Bei dieser, nach 48 Stunden festgestellten Viruskonzentration waren alle Tiere gestorben. Beim M-Stamm wurde nach 12 Stunden ein Titer von $10^{4,25}$ bestimmt. Nach 24 und 48 Stunden ergab sich ein Titer von 10^6. Drei Tage nach der Impfung erreichte der Virusgehalt den höchsten Titer 10^7, der am vierten Tag unverändert blieb. Mit einer Differenz von 2 1/2 Titerstufen nach 12 Stunden

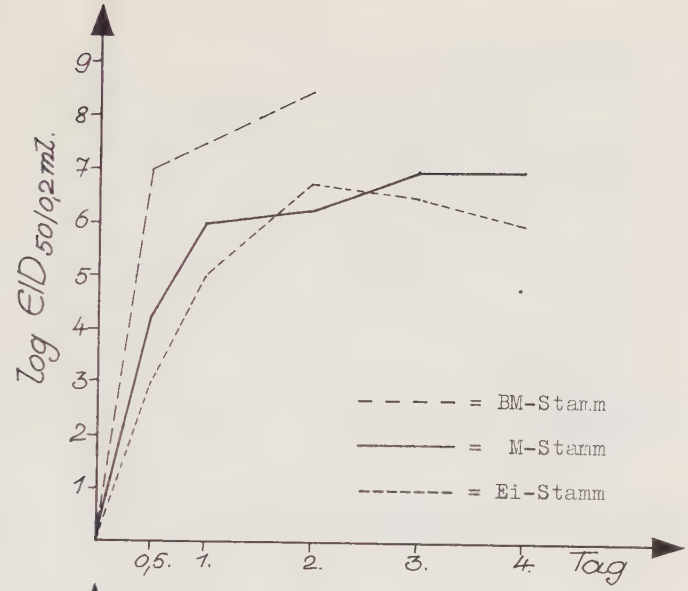

Abb. 2a

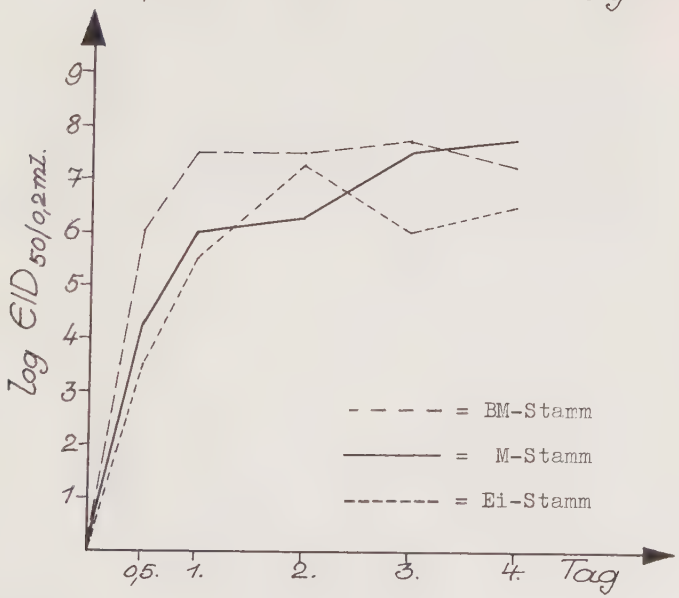

Abb. 2b

Abb. 2: Vermehrungskurven von Tübingen/63^{-}-Varianten
a. in der Lunge der neugeborenen Maus
b. in der Lunge der erwachsenen Maus

und am zweiten Tag hat sich damit der M-Stamm deutlich langsamer und geringer in der neugeborenen Maus vermehrt als der BM-Stamm. Die Vermehrung des Ei-Stammes setzte noch zögernder ein. Die Differenz betrug nach 12 Stunden zum BM-Stamm 4 Titerstufen, zum M-Stamm 1 1/2. Der Virusgehalt erreichte am zweiten Tag einen Maximaltiter von fast 10^7, fiel dann aber bis zum vierten Tag wieder auf eine Titerhöhe von 10^6.

Abb. 2b: Betrachtet man die Titer, die in der Lunge der erwachsenen Maus erzielt wurden, so zeigt sich, daß auch hier der BM-Stamm schnell einen hohen Titer erreichte. Nach 24 Stunden wurde 10^7 gemessen. Die Titer des Ei- und des M-Stammes verhielten sich in den ersten 24 Stunden etwa gleich: nach 12 Stunden 2,5 (bzw. 1,7), am ersten Tag 2 (bzw. 1,5) Titerstufen niedriger als die des BM-Stammes. Am zweiten Tag erreichte der Ei-Stamm einen Maximaltiter von $10^{7,25}$ und sank dann wieder auf 10^6 ab. Der Titer des M-Stammes stieg weiter an und erreichte mit dem Titer $10^{7,5}$ die Konzentration des BM-Stammes.

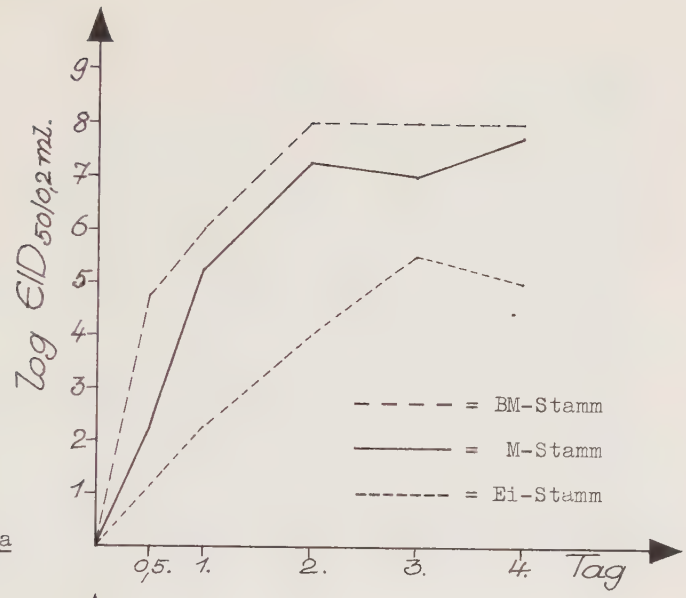

Abb. 3a

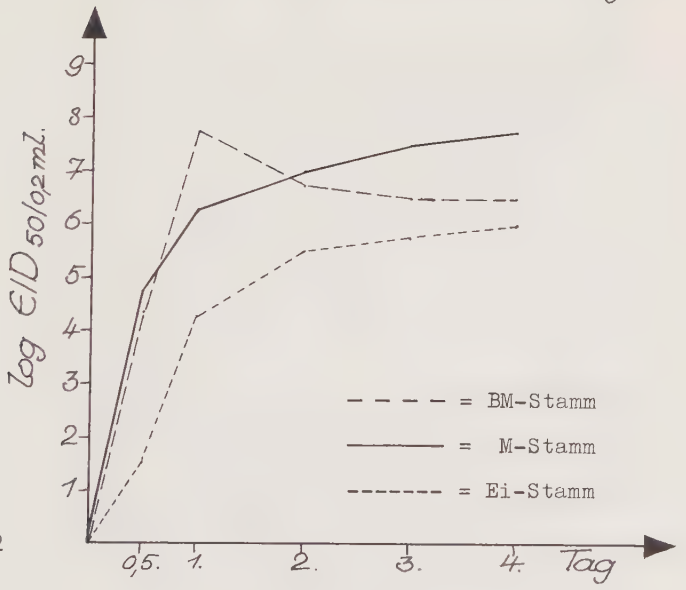

Abb. 3b

Abb. 3: Vermehrungskurven von AA1/65^{+}-Varianten
a. in der Lunge der neugeborenen Maus
b. in der Lunge der erwachsenen Maus

Abb. 3 stellt die Vermehrungskurven der AA1/65^{+}-Varianten dar.

Abb. 3a: Auch bei diesem Versuch erreichte der BM-Stamm in der Lunge des Neugeborenen schon nach 12 Stunden einen Titer, der 2 1/2 Titerstufen über dem des M-Stammes und 3 1/2 Titerstufen über dem des Ei-Stammes lag. Dann allerdings verringerte sich die Differenz zum M-Stamm bis auf Titerwerte, die im Grenzbereich der Signifikanz liegen:
am ersten Tag hatte der BM-Stamm einen Titer von 10^{6} gegenüber dem Titer $10^{5,25}$ des M-Stammes; am zweiten Tag von 10^{8} gegenüber $10^{7,25}$; am dritten Tag von 10^{8} gegenüber 10^{7}; am vierten Tag von 10^{8} gegenüber $10^{7,75}$. Der Ei-Stamm vermehrte sich sehr langsam und erreichte am dritten Tag als höchsten Titer 10^{5}.

Abb. 3b zeigt die Verhältnisse in der Lunge der erwachsenen Maus. Hier bestanden zwar nach 12 Stunden keine Titerdifferenzen zwischen BM- und M-Stamm, jedoch überragte nach weiteren 12 Stunden der Titer des BM-Stammes mit $10^{7,75}$ den des M-Stammes um 1 1/2 Titerstufen. Während im folgenden der Titer des M-Stammes kontinuierlich weiter anstieg und am vierten Tag schließlich auch $10^{7,75}$ erreichte, fiel der Titer des BM-Stammes schnell wieder ab. Er war am zweiten Tag wieder dem des M-Stammes gleich und am dritten und vierten Tag mit dem Titer $10^{6,5}$ um etwa 1 Titerstufe niedriger als dieser.
Die Viruskonzentration des Ei-Stammes stieg auch in der Lunge der erwachsenen Maus langsam an. Sie betrug am ersten Tag $10^{4,25}$; am zweiten bis vierten Tag zwischen $10^{5,5}$ und 10^{6}.

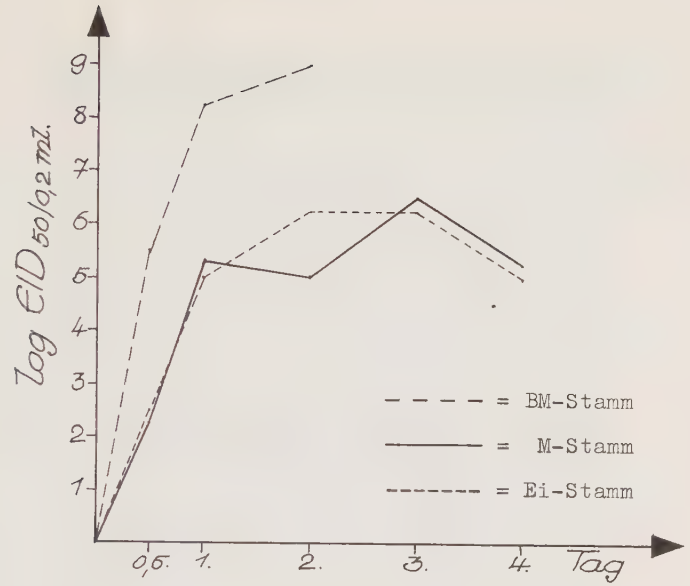

Abb. 4a

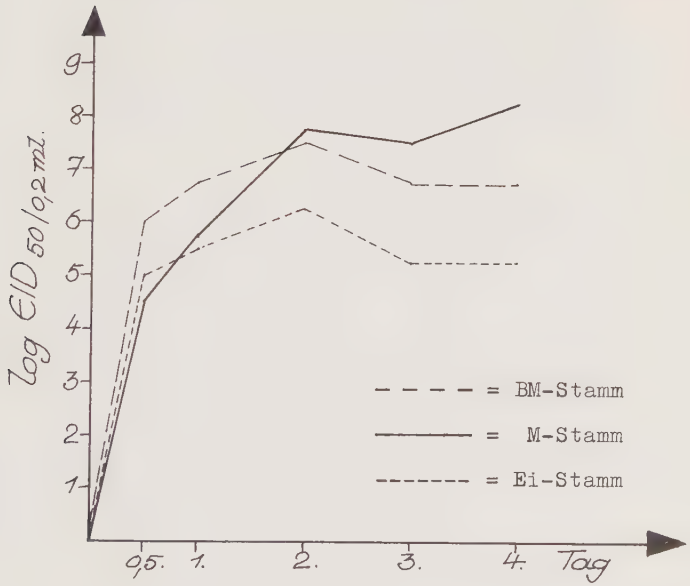

Abb. 4b

Abb. 4: Vermehrungskurven von RI5/57^{+} und AA/63^{+}-Varianten
a. in der Lunge der neugeborenen Maus
b. in der Lunge der erwachsenen Maus

Abb. 4 zeigt die Vermehrung des BM- und des Ei-Stammes von RI5/57^{+} und des M-Stammes von AA/63^{+}.

Abb. 4a: Wie in den vorangegangenen beiden Versuchen stieg auch hier der Titer des BM-Stammes in der Lunge des Neugeborenen schneller an als der des M-Stammes. Der M- und der Ei-Stamm verhielten sich bis zum ersten Tag gleich, die Titerdifferenz zum BM-Stamm betrug 3. Der BM-Stamm erreichte am zweiten Tag eine maximale Titerhöhe von 10^{9}. Bei dieser Konzentration waren alle Tiere gestorben. Der Titer des M-Stammes wies vom zweiten bis vierten Tag starke Schwankungen auf. Er sank am zweiten Tag sogar mehr als eine Titerstufe unter den Titer des Ei-Stammes. Am dritten und vierten Tag waren beide Titer wieder gleich hoch. Die Konzentration war am dritten Tag mit einem Titer von 10^{7} am höchsten, am vierten Tag wurde ein Titer von $10^{5,25}$ gemessen, was der Konzentration am ersten und zweiten Tag entsprach.

Abb. 4b: In der Lunge der erwachsenen Maus zeigte der BM-Stamm ebenfalls wieder einen schnellen Anstieg. Sein Titer lag nach 12 Stunden um 1 1/2 und am ersten Tag um 1 Titerstufe über dem des M-Stammes. Am zweiten Tag hatten der BM- und der M-Stamm denselben Titer um $10^{7,5}$. Während der Titer des M-Stammes bis zum vierten Tag auf $10^{8,25}$ anstieg, fiel derjenige des BM-Stammes auf $10^{6,75}$ ab. Damit bestätigte sich das bei Tübingen/63^{-} angedeutete und bei AA1/65^{+} deutliche Absinken des Titers vom BM-Stamm unter den des M-Stammes nach anfänglich höherem Anstieg des ersteren. Die Titer des Ei-Stammes lagen 1 bis 1 1/2 Titer unter dem des BM-Stammes.

b.) EID_{50}-Werte, Hämagglutinationstiter, Lungenläsionen

In Tab. 2 werden alle Meßwerte genannt, die sich aus dem Versuch ergaben, die Vermehrungsgeschwindigkeit verschiedener Varianten dreier Substämme in der Lunge von neugeborenen und erwachsenen Mäusen zu erfassen.

Die Bestimmung der EID_{50}-Werte bedarf eines großen Aufwands an bebrüteten Eiern und an Zeit. Es stellte sich die Frage, ob sich die Virusvermehrung auch in den leicht zu bestimmenden Hämagglutinationstitern zeigt. Außer Eititrationen wurden deshalb von den einzelnen Proben Hämagglutinationsreaktionen durchgeführt. Um möglichst viel Hämagglutinin freizusetzen, wurde das Lungenmaterial vorher mit Trypsin behandelt.

Eine Vermehrungstendenz zeigt sich in den von der Neugeborenen-Lunge gewonnenen Hämagglutinationstitern. Der Versuch mit Erwachsenen-Lungenmaterial führte nur bei AA1/65^{+}-Stämmen zu brauchbaren Werten.

Eine konstante Beziehung zu der Höhe der EID_{50}-Werte läßt sich nicht aufdecken.

Weiterhin sind in Tab. 2 die makroskopisch sichtbaren Lungenläsionen der einzelnen Gruppen angegeben. Die Entwicklungstendenz sowohl der EID_{50}-Werte als auch der Lungenläsionen entsprach sich bei allen drei Substämmen. Um diese Tendenz deutlich darzustellen, wurden Durchschnittswerte errechnet und in Tab. 3 angegeben.

Tübingen/63⁻							
Wirt	Varianten	Verfahren	12 Std.	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag
Neugeborene Mäuse	BM-Stamm	Lungenläsionen %	0	3	100	-	-
		Hämagglutinationstiter	10	160	640	-	-
		log EID_{50}	7	7,5	8,5	-	-
	M-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	10	67	70
		Hämagglutinationstiter	80	80	80	80	160
		log EID_{50}	4,25	6	6,25	7	7
	Ei-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	33	62	30
		Hämagglutinationstiter	80	40	320	80	80
		log EID_{50}	3	5	6,75	6,5	6
Erwachsene Mäuse	BM-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	0	37	47
		Hämagglutinationstiter	<5	10	10	10	5
		log EID_{50}	6	7,5	7,5	7,75	7,25
	M-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	0	0	10
		Hämagglutinationstiter	<5	<5	<5	<5	<5
		log EID_{50}	4,25	6	6,25	7,5	7,75
	Ei-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	0	0	7
		Hämagglutinationstiter	<5	<5	5	5	5
		log EID_{50}	3,5	5,5	7,25	6	6,5

Tab. 2: Virusvermehrung in der Lunge von neugeborenen und erwachsenen Mäusen

Teil 1: Impfung mit den Varianten des Substammes Tübingen/63⁻

AA1/65$^+$							
Wirt	Varianten	Verfahren	12 Std.	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag
Neugeborene Mäuse	BM-Stamm	Lungenläsionen %	0	3	50	93	80
		Hämagglutinationstiter	320	160	640	1280	640
		log EID_{50}	4,75	6	8	8	8
	M-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	6	46	53
		Hämagglutinationstiter	320	640	640	80	160
		log EID_{50}	2,25	5,25	7,25	7	7,75
	Ei-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	3	3	3
		Hämagglutinationstiter	80	80	320	160	160
		log EID_{50}	<2	2,25	4	5,5	5
Erwachsene Mäuse	BM-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	0	6	13
		Hämagglutinationstiter	20	80	640	640	640
		log EID_{50}	4,25	7,75	6,75	6,5	6,5
	M-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	3	6	13
		Hämagglutinationstiter	40	40	160	640	640
		log EID_{50}	4,75	6,25	7	7,5	7,75
	Ei-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	0	0	0
		Hämagglutinationstiter	20	20	160	160	80
		log EID_{50}	1,5	4,25	5,5	5,75	6

Tab. 2: Teil 2: Impfung mit den Varianten des Substammes AA1/65$^+$

RI5/57$^+$ AA/63$^+$							
Wirt	Varianten	Verfahren	12 Std.	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag
Neugeborene Mäuse	BM-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	90	-	-
		Hämagglutinationstiter	80	160	640	-	-
		log EID_{50}	5,5	8,25	9	-	-
	M-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	0	13	3
		Hämagglutinationstiter	160	80	80	640	160
		log EID_{50}	2,25	5,25	5	6,5	5,25
	Ei-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	3	10	20
		Hämagglutinationstiter	80	80	160	160	40
		log EID_{50}	2,5	5	6,25	6,25	5
Erwachsene Mäuse	BM-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	10	13	10
		Hämagglutinationstiter	<5	<5	<5	<5	<5
		log EID_{50}	6	6,75	7,5	6,75	6,75
	M-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	0	10	6
		Hämagglutinationstiter	10	40	<5	<5	<5
		log EID_{50}	4,5	5,75	7,75	7,5	8,25
	Ei-Stamm	Lungenläsionen %	0	0	0	6	3
		Hämagglutinationstiter	20	40	160	40	10
		log EID_{50}	5	5,5	6,25	5,25	5,25

Tab. 2: Teil 3: Impfung mit den Varianten der Substämme RI5/57$^+$ und AA/63$^+$

Durchschnittswerte aller 3 Substämme (aus Tab. 2 errechnet)							
Wirt	Varianten	Verfahren	12 Std.	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag
Neugeborene Mäuse	BM-Stämme	Lungenläsionen %	0	2	.60	98	-
		log EID_{50}	5,75	7,25	8,5	-	-
	M-Stämme	Lungenläsionen %	0	0	5	42	42
		log EID_{50}	2,9	5,5	6,1	6,8	6,7
	Ei-Stämme	Lungenläsionen %	0	0	13	25	18
		log EID_{50}	2,5	4,1	5,7	6,1	5,3
Erwachsene Mäuse	BM-Stämme	Lungenläsionen %	0	0	3	19	23
		log EID_{50}	5,4	7,3	7,3	7,0	6,8
	M-Stämme	Lungenläsionen %	0	0	1	5	10
		log EID_{50}	4,5	6,0	7,0	7,5	7,9
	Ei-Stämme	Lungenläsionen %	0	0	0	2	3
		log EID_{50}	3,3	5,1	6,3	5,7	5,9

Tab. 3: Virusvermehrung in der Lunge von neugeborenen und erwachsenen Mäusen.
Durchschnittswerte aus Tabelle 2
Teil 1, 2 und 3

Aus den Durchschnittswerten der Tab. 3 wurden die Diagramme der Abb. 5 gezeichnet.
Abb. 2, 3 und 4 zeigten das Wachstum der v e r s c h i e d e n e n Varianten eines Stammes auf d e m s e l b e n Wirt.
In Abb. 5 wurde das unterschiedliche Wachstum e i n e r Variante (als Durchschnittswert der entsprechenden Varianten aller drei Stämme) auf Wirten v e r s c h i e d e n e n Alters dargestellt. Außerdem wurden die durchschnittlichen Lungenläsionen der jeweiligen Gruppe angegeben.
Abb. 5a zeigt die Stämme, die nur Ei-Passagen hatten. Diese vermehrten sich in der neugeborenen Maus geringfügig langsamer als in der erwachsenen. Sie erreichten am zweiten Tag einen Maximaltiter um 10^6 EID_{50}, der mit geringen Schwankungen auch an den weiteren Tagen bestehen blieb. Die Lunge der erwachsenen Maus zeigte vom dritten Tag ab sehr geringe Läsionen: weniger als 10 % der maximal möglichen. Die Neugeborenen-Lunge zeigte schon am zweiten Tag deutliche Läsionen. Am dritten Tag betrugen diese 25 %. Am vierten Tag waren weniger als 20 % Läsionen nachweisbar.
Abb. 5b zeigt die BM-Stämme, die an die neugeborene Maus adaptiert waren. Sie vermehrten sich in den ersten 48 Stunden in der Lunge der neugeborenen und der erwachsenen Maus gleich schnell zu einem Titer von $10^{7,25}$ EID_{50}. (Ein so hoher Titer wurde von den Ei-Stämmen nicht erreicht)
Nach dem ersten Tag stieg der Titer in der Neugeborenen-Lunge weiter an und wirkte bei Titern über 10^8 EID_{50} tödlich. In der Erwachsenen-Lunge änderte sich der Virusgehalt in den folgenden Tagen nur geringfügig.

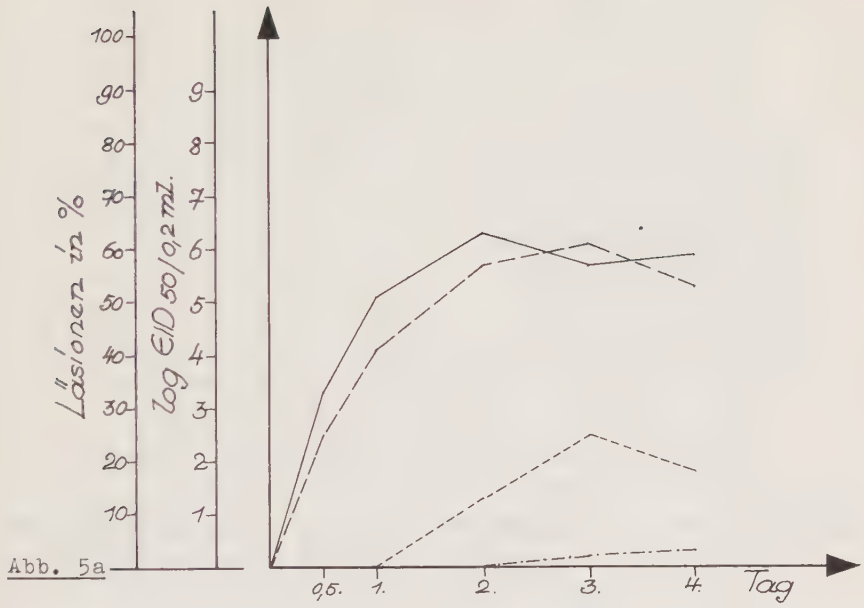

Abb. 5a

– – – – = EID_{50}-Werte der Neugeborenen-Lunge

———— = EID_{50}-Werte der Erwachsenen-Lunge

------- = Läsionen in der Neugeborenen-Lunge

-.-.-.- = Läsionen in der Erwachsenen-Lunge

Abb. 5: Virusgehalt und Infektionsauswirkungen in der Lunge
a. bei den Ei-Stämmen
b. bei den BM-Stämmen
c. bei den M-Stämmen

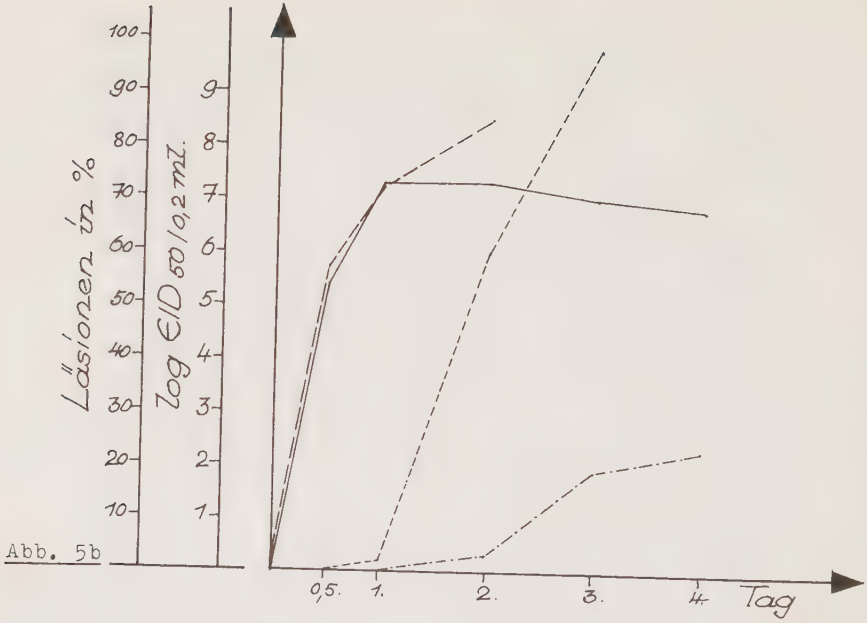
Läsionen in %
log EID 50/0,2 mL.
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0,5.
1.
2.
3.
4.
Tag

Abb. 5b

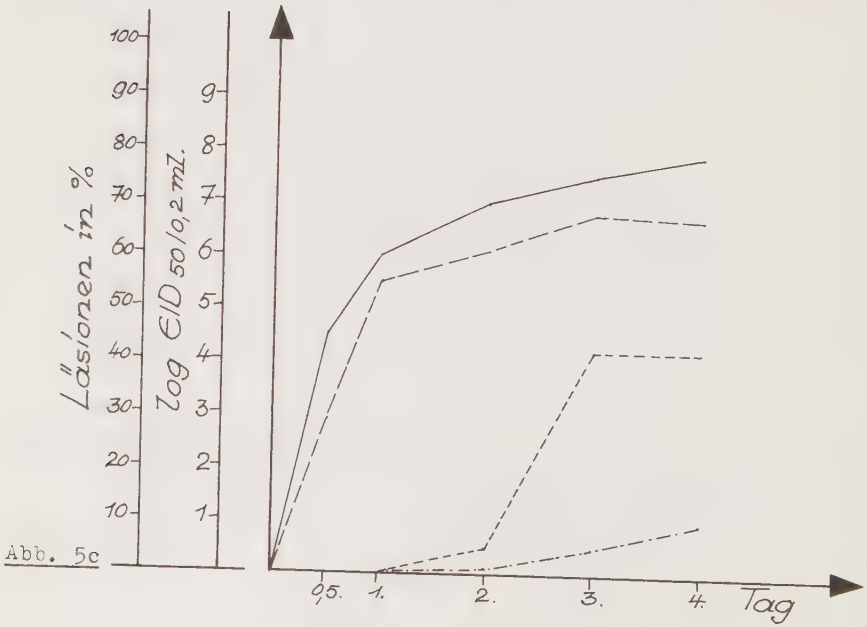
Läsionen in %
log EID 50/0,2 mL.
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0,5.
1.
2.
3.
4.
Tag

Abb. 5c

Bei der hohen Viruskonzentration des ersten Tages zeigten die Neugeborenen minimale, die Erwachsenen gar keine Lungenläsionen. Einen Tag später wiesen die Neugeborenen-Lungen 60 % Läsionen auf. Nach einem weiteren Tag lebten keine Neugeborenen mehr, die Läsionen betrugen 100 %. Die Lungen der Erwachsenen zeigten erst am dritten Tag deutliche Läsionen, also zwei Tage nachdem der Virusgehalt seinen höchsten Titer erreicht hatte. Die Läsionen betrugen weniger als 25 %.

Abb. 5c zeigt die M-Stämme, die an die erwachsene Maus adaptiert waren. Diese erreichten nach 12 Stunden einen Titer von $10^{4,5}$ EID_{50} in der Erwachsenen-Lunge. Dieser Wert liegt deutlich über dem von den Ei-Stämmen und unter dem von den BM-Stämmen erzielten. Bis zum vierten Tag stieg der Virusgehalt an auf einen Titer von 10^{8} EID_{50}. Der M-Stamm erreichte damit von allen drei Varianten die höchste Viruskonzentration in der Erwachsenen-Lunge. In der Lunge der neugeborenen Maus stieg der Titer langsamer an und erreichte kaum einen Wert von 10^{7} EID_{50} am dritten und vierten Tag.

Trotz des hohen Virusgehaltes wiesen die Erwachsenen-Lungen nur Läsionen auf von durchschnittlich 10 % am vierten Tag. Die Lungen der Neugeborenen zeigten am dritten und vierten Tag Läsionen von über 40 %. Das waren deutlich mehr als bei den Ei-Stämmen, aber weniger und später einsetzende als bei den BM-Stämmen.

3. Überlebenszeiten

Die Überlebenszeiten wurden nach der auf Seite 8 beschriebenen Methode ermittelt. In Vorversuchen ergab sich, daß für die Neugeborenen Impfkonzentrationen gewählt werden müssen, die um einige Zehnerpotenzen niedriger sind, als diejenigen für die Erwachsenen. Insbesondere beim Vergleich der harmonischen Mittel muß dieser Unterschied in der Konzentration des Impfmaterials bedacht werden.

Tab. 4 zeigt die Überlebenszeiten von neugeborenen und erwachsenen Mäusen nach Impfung mit Tübingen/63^{-}-Varianten. Bei einer Impfkonzentration von 10^3 EID_{50} waren von den Neugeborenen beim BM-Stamm am dritten Tag alle zehn, beim M-Stamm am zehnten Tag alle zehn, beim Ei-Stamm am zehnten Tag drei Tiere gestorben.

Wurde mit einer zehnfach geringeren Konzentration geimpft, so überlebten den zehnten Tag beim BM-Stamm ein Tier, beim M-Stamm acht, beim Ei-Stamm alle zehn Tiere.

Von den erwachsenen Mäusen waren bei einer Impfkonzentration von 10^5 EID_{50} beim BM-Stamm am vierten Tag alle und beim M-Stamm am siebten Tag alle Tiere gestorben; beim Ei-Stamm überlebten alle Tiere. Wurde mit einer zehnfach geringeren Konzentration geimpft, so überlebte beim BM-Stamm kein Tier den siebten Tag, beim M-Stamm lebten am zehnten Tag noch vier, beim Ei-Stamm noch alle Tiere.

Der BM-Stamm war nicht nur für die neugeborene, sondern auch für die erwachsene Maus sehr virulent. Er führte bei beiden Altersstufen zu einem schnelleren Sterben der Tiere als der M-Stamm.

Entsprechendes konnte aus den, in Tab. 2 genannten, Lungenläsionen erkannt werden.

Stamm	Infl. A_2/Tübingen/63$^-$								
Mäuse	10 Neugeborene pro Verdünnungsstufe								
Varianten	$E_{10}BM_{35}E_1$ (BM-Stamm)			$E_9BM_{10}M_{25}ET_1E_6$ (M-Stamm)			E_{11} (Ei-Stamm)		
Konzentration d.Impfmaterials in EID_{50}	10^3	10^2	10^1	10^3	10^2	10^1	10^3	10^2	10^1
Überlebende									
am 1. Tag	10	10	10	10	10	10	10	10	10
am 2. Tag	10	10	10	10	10	10	10	10	10
am 3. Tag	-	10	10	10	10	10	10	10	10
am 4. Tag	-	7	10	10	10	10	10	10	10
am 5. Tag	-	2	6	10	10	10	10	10	10
am 6. Tag	-	2	5	7	10	10	10	10	9
am 7. Tag	-	2	3	4	10	10	8	10	9
am 8. Tag	-	1	3	2	9	10	8	10	9
am 9. Tag	-	1	2	2	8	10	8	10	9
am 10.Tag	-	1	2	-	8	10	7	10	9
Lungenläsionen der am 10. Tag sez.Tiere	-	1(3+)	0	-	1(2+) 7(0)	0	2(3+) 1(2+) 4(1+)	2(1+) 8(0)	0
harmon. Mittel der Überlebenszt.in Tagen	3	5,3	7,3	7,3	42,4	∞	25,9	60	∞

Tab. 4: Impfung mit Tübingen/63$^-$-Varianten

Teil 1: Überlebenszeiten von neugeborenen Mäusen

Stamm	Infl. A_2/Tübingen/63								
Mäuse	6 Erwachsene pro Verdünnungsstufe								
Varianten	$E_{10}BM_{35}E_1$ (BM-Stamm)			$E_9BM_{10}M_{25}ET_1E_6$ (M-Stamm)			E_{11} (Ei-Stamm)		
Konzentration d.Impfmaterials in EID_{50}	10^5	10^4	10^3	10^6	10^5	10^4	10^6	10^5	10^4
Überlebende									
am 1. Tag	6	6	6	6	6	6	6	6	6
am 2. Tag	6	6	6	6	6	6	6	6	6
am 3. Tag	5	6	6	6	6	6	6	6	6
am 4. Tag	-	5	6	6	6	6	6	6	6
am 5. Tag	-	4	6	5	5	6	6	6	6
am 6. Tag	-	3	5	3	2	6	6	6	6
am 7. Tag	-	1	4	1	-	6	6	6	6
am 8. Tag	-	-	2	-	-	5	6	6	6
am 9. Tag	-	-	2	-	-	5	6	6	6
am 10.Tag	-	-	1	-	-	4	5	6	6
Lungenläsionen der am 10. Tag sez.Tiere	-	-	1(4+)	-	-	2(4+) 2(3+)	1(4+) 1(2+) 3(1+)	2(2+) 3(1+) 1(0)	1(1+) 5(0)
harmon. Mittel der Überlebenszt.in Tagen	3,8	6,4	9,1	6,4	6,1	26,7	60	∞	∞

Tab. 4: Teil 2: Überlebenszeiten von erwachsenen Mäusen

Tab. 5 zeigt die Ergebnisse des Versuchs mit dem BM-Stamm und dem Ei-Stamm von RI5/57^{+} und dem M-Stamm von AA/63^{+}.
Von je zehn Neugeborenen, die mit einer Konzentration von 10^{3} EID_{50} geimpft worden waren, lebten am siebten Tag beim BM-Stamm keine Tiere mehr, beim M-Stamm noch zwei, beim Ei-Stamm noch drei Tiere. Nach Impfung mit zehnfach geringerer Konzentration lebten am zehnten Tag beim BM-Stamm noch zwei Tiere, beim M-Stamm noch fünf und beim Ei-Stamm noch sieben Tiere. Während im vorangegangenen Versuch mit Tübingen/63^{-}-Varianten der Ei-Stamm eine deutlich geringere Infektionsauswirkung zeigte als der M-Stamm, war in diesem Versuch die Virulenz des Ei-Stammes fast gleich wie die des M-Stammes. Beide wirkten auch hier deutlich geringer als der BM-Stamm.

Von je sechs Erwachsenen, die mit einer Konzentration von 10^{4} EID_{50} geimpft worden waren, lebte beim BM-Stamm am zehnten Tag noch ein Tier, beim M-Stamm überlebten fünf, beim Ei-Stamm alle sechs Tiere. In höheren Konzentrationen wirkte der BM- und der M-Stamm fast gleich stark. Der Ei-Stamm war wenig virulent: es kamen keine Todesfälle vor, die Sektion ergab nur schwache Lungenläsionen.

Stamm	Infl. A_2/RI5/57$^+$ und Infl. A_2/AA/63$^+$								
Mause	10 Neugeborene pro Verdünnungsstufe								
Varianten	$E_{11}BM_{27}E_1$ (BM-Stamm)			$E_{13}BM_{12}M_{17}ET_2$ (M-Stamm)			E_{18} (Ei-Stamm)		
Konzentration d.Impfmaterials in EID_{50}	10^3	10^2	10^1	10^3	10^2	10^1	10^3	10^2	10^1
Überlebende									
am 1. Tag	10	10	10	10	10	10	10	10	10
am 2. Tag	10	10	10	10	10	10	10	10	10
am 3. Tag	5	10	10	10	10	10	10	10	10
am 4. Tag	1	9	10	10	10	9	10	10	10
am 5. Tag	1	7	9	10	10	9	10	10	10
am 6. Tag	1	6	7	10	10	9	10	10	10
am 7. Tag	-	4	6	8	9	9	7	10	10
am 8. Tag	-	4	6	4	7	9	3	7	10
am 9. Tag	-	2	6	3	5	9	3	7	10
am 10.Tag	-	2	6	3	5	9	3	7	10
Lungenläsionen der am 10. Tag sez.Tiere	-	2(3+)	1(2+) 5(0)	1(2+) 2(0)	2(3+) 1(2+) 2(0)	2(1+) 7(0)	3(0)	1(2+) 6(0)	0
harmon. Mittel der Überlebenszt.in Tagen	3,8	7,5	14,8	11,1	16,3	40	10,8	26,7	∞

Tab. 5: Impfung mit dem BM- und dem Ei-Stamm von RI5/57$^+$ und dem M-Stamm von AA/63$^+$

Teil 1: Überlebenszeiten von neugeborenen Mäusen

Stamm	Infl. A_2/RI5/57$^+$ und Infl. A_2/AA/63$^+$								
Mäuse	6 Erwachsene pro Verdünnungsstufe								
Varianten	$E_{11}BM_{27}E_1$ (BM-Stamm)			$E_{13}BM_{12}M_{17}ET_2$ (M-Stamm)			E_{18} (Ei-Stamm)		
Konzentration d.Impfmaterials in EID_{50}	10^6	10^5	10^4	10^6	10^5	10^4	10^6	10^5	10^4
Überlebende am 1. Tag	6	6	6	6	6	6	6	6	6
am 2. Tag	6	6	6	6	6	6	6	6	6
am 3. Tag	5	3	6	6	6	6	6	6	6
am 4. Tag	4	3	5	5	6	6	6	6	6
am 5. Tag	2	3	3	1	5	6	6	6	6
am 6. Tag	2	2	2	1	5	6	6	6	6
am 7. Tag	2	2	1	1	4	6	6	6	6
am 8. Tag	2	2	1	1	2	6	6	6	6
am 9. Tag	2	2	1	1	2	6	6	6	6
am 10.Tag	2	2	1	1	2	5	6	6	6
Lungenläsionen der am 10. Tag sez.Tiere	2(4+)	0	0	1(1+)	1(4+) 1(2+)	1(3+) 1(2+) 3(0)	2(2+) 4(0)	0	0
harmon. Mittel der Überlebenszt.in Tagen	6,1	7,2	6,3	5,1	10,7	60	∞	∞	∞

Tab. 5: Teil 2: Überlebenszeiten von erwachsenen Mäusen

In Tab. 6 wurden die Überlebenszeiten von neugeborenen und erwachsenen Mäusen nach Impfung mit AA1/65^{+}-Varianten dargestellt.
Die Neugeborenen erkrankten auch hier nach Impfung mit dem BM-Stamm am schwersten. Der M-Stamm rief geringe, der Ei-Stamm keinerlei Läsionen hervor.
Im Gegensatz zu den beiden vorangegangenen Versuchen, war die letale Wirkung des BM-Stammes auf die erwachsene Maus gering. Erst durch Sektion konnten starke Lungenläsionen nachgewiesen werden.
Von sechs, mit dem M-Stamm geimpften Mäusen, überlebten bei Konzentrationen von 10^6 EID_{50} und 10^5 EID_{50} nur zwei Tiere den zehnten Tag.
Bei den mit dem Ei-Stamm geimpften Erwachsenen kam es zu keinen Todesfällen. Allerdings konnten durch Sektion am zehnten Tag deutliche Lungenläsionen nachgewiesen werden.
Zusammenfassend ergab sich: Die vom Ei-Stamm hervorgerufene Infektion war bei Mäusen beider Altersstufen gering. Der BM-Stamm war besonders virulent für die neugeborene, der M-Stamm für die erwachsene Maus. Der Vergleich mit Tab. 2 zeigt, daß sich aus den in den ersten vier Tagen nach der Impfung beobachteten Lungenläsionen kein Anhalt für eine deutlich stärkere Virulenz des M-Stammes gegenüber des BM-Stammes auf die erwachsene Maus ergab.
Bei den anderen Varianten lassen sich zu diesem Zeitpunkt anhand der Lungenläsionen schon dieselben Tendenzen erkennen wie aus den Überlebenszeitbestimmungen.

Stamm	Infl. $A_2/AA1/65^+$								
Mäuse	10 Neugeborene pro Verdünnungsstufe								
Varianten	$E_9BM_{29}E_1$ (BM-Stamm)			$E_9BM_{10}M_2ET_1M_{15}ET_3E_1$ (M-Stamm)			E_{17} (Ei-Stamm)		
Konzentration d.Impfmaterials in EID_{50}	10^3	10^2	10^1	10^3	10^2	10^1	10^3	10^2	10^1
Überlebende									
am 1. Tag	10	10	10	10	10	10	10	10	10
am 2. Tag	10	10	10	10	10	10	10	10	10
am 3. Tag	10	10	10	10	10	10	10	10	10
am 4. Tag	6	10	10	10	10	10	10	10	10
am 5. Tag	2	10	10	10	10	10	10	10	10
am 6. Tag	2	8	7	10	10	10	10	10	10
am 7. Tag	-	7	7	7	10	10	10	10	10
am 8. Tag	-	6	7	7	10	10	10	10	10
am 9. Tag	-	6	6	1	10	10	10	10	10
am 10.Tag	-	4	6	1	10	10	10	10	10
Lungenläsionen der am 10. Tag sez.Tiere	-	2(2+) 2(0)	3(2+) 3(0)	1(2+)	3(3+) 3(2+) 4(0)	1(2+) 3(1+) 6(0)	0	0	0
harmon. Mittel der Überlebenszt.in Tagen	4,8	12,5	16,4	9,1	∞	∞	∞	∞	∞

Tab. 6: Impfung mit $AA1/65^+$-Varianten

Teil 1: Überlebenszeiten von neugeborenen Mäusen

Stamm	Infl. $A_2/AA1/65^+$								
Mäuse	6 Erwachsene pro Verdünnungsstufe								
Varianten	$E_9BM_{29}E_1$ (BM-Stamm)			$E_9BM_{10}M_2ET_1M_{15}ET_3E_1$ (M-Stamm)			E_{17} (Ei-Stamm)		
Konzentration d.Impfmaterials in EID_{50}	10^6	10^5	10^4	10^6	10^5	10^4	10^6	10^5	10^4
Überlebende									
am 1. Tag	6	6	6	6	6	6	6	6	6
am 2. Tag	6	6	6	6	6	6	6	6	6
am 3. Tag	6	6	6	5	6	6	6	6	6
am 4. Tag	6	6	6	3	6	6	6	6	6
am 5. Tag	6	6	6	2	6	6	6	6	6
am 6. Tag	6	6	6	2	6	6	6	6	6
am 7. Tag	6	5	6	2	5	6	6	6	6
am 8. Tag	6	5	6	2	3	6	6	6	6
am 9. Tag	6	5	6	2	2	5	6	6	6
am 10.Tag	6	5	6	2	2	5	6	6	6
Lungenläsionen der am 10. Tag sez.Tiere	1(4+) 3(3+) 2(2+)	2(4+) 2(3+) 1(1+)	2(4+) 3(3+) 1(1+)	1(4+) 1(3+)	2(3+)	1(3+) 3(2+) 1(0)	1(4+) 2(3+) 1(2+) 2(0)	1(4+) 2(2+) 3(0)	3(2+) 3(0)
harmon. Mittel der Überlebenszt.in Tagen	∞	42	∞	5,8	15,3	54	∞	∞	∞

Tab. 6: Teil 2: Überlebenszeiten von erwachsenen Mäusen

IV. Besprechung

Im Verlauf der Adaptation konnte eine allmähliche Steigerung der Virulenz (manifestiert durch das Ausmaß der Lungenläsionen) und eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber Pferdeseruminhibitoren beobachtet werden. Die Feststellung von COHEN und BIDDLE (1960), daß die Mausadaptation zu einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Pferdeseruminhibitoren führt, scheint demnach auch für die Adaptation an neugeborene Mäuse zu gelten.

GERTH, der 1968 durch umfangreiche Analysen zeigte, daß die Partikel eines Stammes verschiedene Aviditätsgrade besitzen, konnte in Zellkulturen keine Unterschiede in der Infektiosität feststellen, die der Inhibitorenempfindlichkeit entsprächen.

In vorliegender Arbeit wurde auf eine nähere Aufschlüsselung der Stämme, auf eine Differenzierung nach der Inhibitorenempfindlichkeit verzichtet. Es wurde versucht, die Virulenzsteigerung mit der Vermehrungsfähigkeit in Beziehung zu setzen.

Es ist nicht allein von den Eigenschaften des Virus abhängig, wie gut und schnell es sich im betroffenen Organ vermehren kann, welche Auswirkungen es zeitigt. Die Beschaffenheit des infizierten Organismus ist für die Reaktion gleichermaßen verantwortlich. Inwieweit das Alter hierbei eine Rolle spielt, wurde beobachtet. Es wurden deshalb die an die neugeborene Maus adaptierten Stämme auch auf die erwachsene Maus verimpft, ihre Vermehrung gemessen und die Krankheitszeichen beobachtet. Zum Vergleich wurden Eilinien und an die erwachsene Maus adaptierte Stämme herangezogen und ebenfalls auf Mäusen verschiedenen Alters beobachtet.

Es ergab sich Folgendes:
In der Lunge des neugeborenen Tieres vermehrten sich die an Neugeborene adaptierten Stämme sehr viel rascher und in größerem Umfang als die Stämme, die nur Alpassagen aufwiesen. Dieser Effekt konnte durch die Adaptation an die erwachsene Maus nicht erhielt werden. Solche Stämme vermehrten sich im jungen Tier gleich (AA/63$^+$) oder zwar besser (Tübingen/63$^-$ und AA'/63$^-$) als die Ei-Stämme, aber nicht so gut wie die an Neugeborene adaptierten Stämme.
Auf einen unterschiedlichen Adaptationsgrad kann dies nicht zurückgeführt werden. Zählt man die initialen Neugeborenenpassagen mit, so hatten die verglichenen Stämme etwa die gleiche Anzahl von Passagen. Die Tatsache, daß manche Stämme zusätzliche Ei-Passagen (maximal sechs) oder Ei-Titrationen (maximal vier) aufwiesen, kann auf Grund von BRIODY's Untersuchungen (1961) vernachlässigt werden. Er zeigte, daß zehn Ei-Passagen mit oder ohne Grenzverdünnung keine Änderungen in der Wachstumsgeschwindigkeit und im Hervorrufen von Lungenläsionen bewirkten. Daß durch die Adaptation an Mäuse verschiedenen Alters, Varianten eines Virusstammes mit unterschiedlichen Vermehrungsfähigkeiten entstehen, zeigt auf, daß die den Infektionsablauf beim Neugeborenen determinierenden Faktoren sich qualitativ oder quantitativ von denen unterscheiden, die beim Erwachsenen wirksam werden. Der Kreuzversuch machte diese Unterschiede deutlich.
Die Fähigkeit, sich rasch zu vermehren, zeigte der an Neugeborene adaptierte Stamm auch in der erwachsenen Maus. Er erzielte einen hohen Anfangstiter, der in den folgenden Tagen aber wieder abnahm. Im Gegensatz dazu vermehrte sich der an Erwachsene adaptierte

Stamm in der Lunge der erwachsenen Maus kontinuierlich weiter.
In der Beobachtungszeit schien für die Infektionsauswirkung vor allem die Schnelligkeit der Virusvermehrung bedeutsam zu sein. Je schneller der Virusgehalt anstieg, umso schwerer erkrankten die Tiere. Die an Neugeborene adaptierten Stämme, die sich durch eben diese Schnelligkeit ihres Anstiegs auszeichneten, zeigten zugleich die stärksten Infektionsauswirkungen bei jungen und erwachsenen Tieren. Eine Ausnahme davon machte der AA1/65^{+} Stamm. Durch die Überlebenszeitbestimmung zeigte sich in diesem Fall, daß der an Neugeborene adaptierte Stamm relativ virulenter für die neugeborene, der an Erwachsene adaptierte Stamm nur für die erwachsene Maus besonders virulent war. In allen anderen Versuchen reagierte das Neugeborene empfindlicher auf die Infektion. Es zeigte stärkere und früher auftretende Lungenläsionen, sowie eine kürzere Überlebenszeit.

HIRST (1947) lehnte einen Zusammenhang zwischen Pathogenitätssteigerung bei der Adaptation und einer besseren Wachstumspotenz des Virus ab. Er konnte bei geringen und starken Läsionen hohe Viruskonzentrationen messen. Der Tatsache, daß diese beim adaptierten Virus schneller erreicht wurden, maß er keine Bedeutung bei.
Im Gegensatz dazu konnte ich nicht nur eine schnellere, sondern auch eine stärkere Virusvermehrung der adaptierten Stämme nachweisen.
Entsprechende Ergebnisse zeigten die Versuche von WANG (1948), der adaptierte und nichtadaptierte Stämme von Influenzaviren verglich. Das adaptierte Virus wuchs schneller und erreichte höhere Titer. Deutlicher als mit der Messung von EID_{50}-Werten

konnte WANG diesen Unterschied durch die Hämagglutination aufzeigen. Die nicht adaptierten Stämme zeigten nur geringe Hämagglutinationstiter, während die adaptierten Stämme sehr hohe aufwiesen. Eigene Versuche konnten dies nicht bestätigen. Ich konnte in den Abweichungen von EID_{50}-Werten und Hämagglutinationstitern keine Regularität und keinen Zusammenhang mit der Adaptation feststellen. Für sich betrachtet, ergaben die Hämagglutinationstiter lediglich einen Anhaltspunkt, eine erste Orientierung über die Vermehrung der Viren in der Lunge. Der schnellere und höhere Anstieg bei den adaptierten Stämmen konnte damit nicht festgestellt werden.

Diese schnellere Vermehrung bestätigten auch die Adaptationsversuche von BRIODY (1955).

Die Fähigkeit, sich besser vermehren zu können und stärkere Infektionsauswirkungen hervorzurufen, schreiben HIRST, BRIODY qualitativen Änderungen des Virus zu.

CASALS und OLITSKY (1951) gelang es, den Lansing-Typ von Poliomyelitis-Viren, gegen den neugeborene Mäuse ursprünglich resistenter als erwachsene waren, durch Adaptation zu einem für diese hochinfektiösen Virus zu verwandeln. Gleichzeitig nahm dadurch die Pathogenität für Erwachsene ab. Immunserologisch konnten sie keine Unterschiede zwischen dem Standardtyp und dem Adaptierten feststellen. Sie definierten die Adaptation als eine Selektion von Partikeln, für die die Zelle des Neugeborenen besonders empfänglich ist.

Faktoren, die die größere Empfindlichkeit junger Tiere bedingen, können auch bei den unterschiedlichen Adaptationsergebnissen bei neugeborenen und erwachsenen Mäusen eine Rolle spielen.

Das Ingangkommen einer Virusinfektion setzt voraus, daß Virus adsorbiert wird, was spezifische Rezeptoren erfordert. Werden diese bei Influenzaviren z. B. mit RDE (=receptor-destroying-enzym, von V.cholerae gewonnener Neuraminidase) zerstört, so kann kein Virus adsorbiert werden, eine Infektion findet nicht statt (FAZEKAS DE ST.GROTH 1948). Die Frage, ob das Rezeptorensystem altersabhängig ist, wirft der Versuch von KUNIN (1962) auf, der zeigte, daß Gehirnzellen von Säuglingsmäusen mehr Coxsackie-B1-Viren adsorbieren, als solche Zellen von erwachsenen Mäusen. Auch MCLAREN und SANDERS (1959) stützten durch Versuche mit Coxsackie-B-Viren die Meinung, daß die Zelle mit wachsender Ausreifung weniger empfänglich für die Virusaufnahme wird.

WAGNER (1955) prüfte die Vermehrungsfähigkeit des speziell an das Mäusegehirn adaptierten Influenza-NWS-Stammes in verschiedenen Geweben, bei verschiedenen Applikationsformen und bei verschiedenen Altersstufen. Dabei stellte er fest, daß sich das Virus in der neugeborenen Maus nahezu pantrop verhielt. Für die Resistenz älterer Tiere gegenüber einer generalisierten NWS-Infektion machte er den Reifegrad der einzelnen Gewebe verantwortlich. OSTROVSKAYA (1937), TAYLOR (1941) und KALTER (1949) zeigten durch Versuche mit Influenza-A-Viren, daß die Hauptvirusvermehrung in den ersten 48 Stunden stattfindet, bevor die Antikörperproduktion einsetzt. Die Virus-Antikörper-Reaktion kann demnach nicht den Krankheitsausbruch sondern nur den späteren Verlauf beeinflussen. OLITSKY und Mitarbeiter (1936) beobachteten, daß es auch eine mit dem Alter erworbene Resistenz ohne vorherige Antikörperbildung gibt.

Antikörper wirken nur auf extracellulär liegende Viren, sie können die Kontaktinfektion von Zelle zu Zelle nicht verhindern. Hier greift das Interferon ein. HEINEBERG und Mitarbeiter (1964) fanden nach Coxsackie-B1-Infektion in den Geweben neugeborener Mäuse nur minimale Interferondosen bei sehr hohem Virusgehalt und starken Krankheitszeichen. Beim erwachsenen Tier waren die Verhältnisse umgekehrt. Sie schließen daraus: "that the failure to produce interferon is one of the important handicaps under which the young individual suffers in coping with virus infections". Zu einer entsprechenden Hypothese kam auch SAWICKI (1961) nach intranasaler Impfung von Mäusen mit Parainfluenza Typ 1 und VILCEK (1965) nach Impfung mit Sindbis-Virus. Andere hingegen fanden keine geringere, ja sogar größere Interferonproduktion in den empfänglicheren jungen Mäusen: CRAIGHEAD (1966) nach intranasaler Impfung mit Parainfluenza Typ 3-Virus, SUBRAHMANYAN (1968) nach Impfung von Cowpox-, West-Nile- und Influenzaviren.
Wie SMART und KILBOURNE (1966) feststellten, scheint Cortison nicht nur auf die Antikörperproduktion, sondern auch auf die Interferonbildung dämpfend zu wirken. Der Einfluß von Cortison auf Virusinfektionen ist nicht nur von der Humanmedizin bekannt. KILBOURNE und HORSFALL (1951) stellten bei cortisonvorbehandelten Mäusen tödliche Erkrankungen nach Coxsackie-B1-Infektion fest, wie sie sonst nur neugeborene Mäuse zeigen.
DALLDORF (1955) beobachtete, daß bei Coxsackie-Infektionen von neugeborenen Mäusen durch Cortisonzufuhr weder der Virustiter der Gewebe, noch die Schwere der Erkrankung zunahmen.

Dies führte er zurück auf den hohen endogenen Cortisongehalt, die Aktivität der Nebennierenrinde in diesem Alter. Die dadurch bedingte Empfindlichkeit würde später durch exogene Cortisonzufuhr hervorgerufen werden können.

Der Hormonspiegel des Neugeborenen scheint demnach eine wichtige Rolle zu spielen.

V. Zusammenfassung

Substämme von Influenza-A_2-Viren, die nur Ei-passagen aufwiesen, vermehrten sich relativ gering in der Lunge der neugeborenen und erwachsenen Maus. Durch Adaptation konnte die Vermehrungsfähigkeit verbessert werden, dabei ergaben sich altersbedingte Unterschiede.

1. Die an die erwachsene Maus adaptierten Stämme vermehrten sich in der Lunge der neugeborenen Maus rascher und besser als die Ausgangsstamme. Noch besser war die Vermehrung in der Erwachsenen-Lunge.

2. Die an die neugeborene Maus adaptierten Stamme erreichten in der Neugeborenen- und Erwachsenen-Lunge noch schneller eine hohe Konzentration, konnten diese dann aber nur in der Neugeborenen-Lunge aufrecht erhalten.

Je rascher ein hoher Virusgehalt in der Lunge erreicht wurde, umso stärkere Lungenlasionen konnten beobachtet werden.
Die Neugeborenen waren besonders empfindlich gegenüber der Infektion.
Es wurden mögliche Faktoren besprochen, die durch qualitative oder quantitative Unterschiede den Infektionsablauf beim Neugeborenen anders gestalten als beim Erwachsenen und möglicherweise auch verantwortlich sind für die altersspezifische Adaptation.

Literaturverzeichnis

1. BRIODY, B. A., CASSEL, W. A., MEDILL, M.A.
Adaptation of influenza virus to mice
II. Changes in the growth curve of an
A Prime strain of influenza virus
J. Imm. 74, 37 - 41 (1955)

2. CASALS, J., OLITSKY, P. K.
The adaptation of Poliomyelitis Virus,
Lansing Strain, to newborn mice and the use
of their central nervous tissues for prepara-
tion of complementfixing antigen
Arch. ges. Virusforschung 4, 452 - 459 (1951)

3. CAVALLI-SFORZA, L.
Grundzüge biologisch-medizin. Statistik
2. Auflage 1969, S. 33
Gustav Fischer Verlag Stuttgart

4. COHEN, A., BIDDLE, F.
The effect of passage in different hosts on
the inhibitor sensitivity of an asian in-
fluenza virus strain
Virology 11, 458 - 473 (1960)

5. COMMITTEE ON STANDARD SEROLOGICAL
PROCEDURES IN INFLUENZA STUDIES
An agglutination inhibition test proposed
as a standard of reference in influenza
diagnostic studies
J. Imm. 65, 347 - 353 (1950)

6. CRAIGHEAD, J. E.
Growth of parainfluenza type 3 virus and
interferon production in infant and adult mice
Brit. J. Exp. Path. 47, 235 - 241 (1966)

7. DALLDORF, G.
The Coxsackie Viruses
Ann. Rev. Microbiol. 9, 277 - 296 (1955)

8. FAZEKAS DE ST. GROTH
Destruction of influenza virus receptors in the
mouse lung by an enzyme from V. cholerae
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 26, 29 - 36 (1948)

9. FENNER, F.
The Biology of Animal Viruses
Vol. II., 607
Academic Press. New York 1968

10. GERTH, H. J.
über die Variabilität von Influenza A_2-Viren
Habilitationsschrift Tübingen 1968

11. GINSBERG, H. S., HORSFALL, F.
Quantitative aspects of the multiplication of influenza A virus in the mouse lung
J. Exp. Med. 95, 135 - 145 (1952)

12. HEINEBERG, H., GOLD, E., ROBBINS, F. C.
Differences in interferon content in tissues of mice of various ages infected with Coxsackie B 1 Virus
Proc. Soc. Exp. Biol. et Med. 115, 947 - 953 (1964)

13. HIRST, G. K.
Studies on the mechanism of adaptation of influenza virus to mice
J. Exp. Med. 86, 357 - 366 (1947)

14. KÄRBER, G.
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmak. 162, 480 - 483 (1931)

15. KALTER, S. S.
The effect of age upon susceptibility to infection with influenza virus
J. Imm. 63, 17 - 22 (1949)

16. KIBRICK, S.
Viral infections of the fetus and newborn
Perspectives in Virology, Vol. II., 140
Pollard M.
Burgess Publishing Minneapolis 1961

17. KILBOURNE, E. D., HORSFALL, F. L.
Lethal infection with Coxsackie virus in adult mice given cortisone
Proc. Soc. Exp. Biol. et Med. 77, 135 - 138 (1951)

18. KUNIN, C. M.
Virus-tissue union and the pathogenesis of enterovirus infections
J. Imm. 88, 556 - 569 (1962)

19. LORENZ, R. J.
Untersuchungen über die Dosis-Wirkungs-Beziehung und die Genauigkeit bei Virustitrierungen
Arch. ges. Virusforschung 10, 560 - 577 (1960)

20. MCLAREN, A., SANDERS, F. F.
Influence of age of the host on local virus multiplication and on resistance to virus infection
J. Hyg. 57, 106 - 122 (1959)

21. OLITSKY, P. K., SABIN, A. B., COX, H. R.
Acquired resistance of growing animals to certain neurotropic viruses in the abscence of humoral antibodies or previous exposure to infection
J. Exp. Med. 64, 723 - 737 (1936)

22. OSTROVSKAYA, S. M.
The distribution of influenza virus in experimentally infected mice
J. Path. et Bact. 44, 559 - 566 (1937)

23. SAWICKI, L.
Influence of age of mice on the recovery from experimental Sendai virus infection
Nature 192, 1258 - 1259 (1961)

24. SMART, K. M., KILBOURNE, E. D.
The influence of cortisone on experimental viral infection
VI. Inhibition by hydrocortisone of interferon synthesis in the chick embryo
J. Exp. Med. 123, 299 - 307 (1966)

25. SUBRAHMANYAN, T. P.
A study of the possible basis of age-dependent resistance of mice to poxvirus diseases
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46, 251 - 265 (1968)

26. TAYLOR, R. M.
Experimental infection with influenza A virus in mice
J. Exp. Med. 73, 43 - 55 (1941)

27. VILCEK, J.
Production of interferon by newborn and adult mice infected with Sindbis Virus
Virology 22, 651 - 652 (1964)

28. WAGNER, R. R.
A pantropic strain of influenza virus:
Generalized infection and viremia in the infant mouse
Virology 1, 497 - 515 (1955)

29. WANG, C. J.
The relation of infections and hemagglutination titers to the adaptation of influenza virus to mice
J. Exp. Med. 88, 515 - 519 (1948)

Die vorliegenden Untersuchungen wurden von Oktober 1967 bis März 1969 im Virus-Labor des Hygiene-Institutes der Universität Tübingen - Direktor Prof. Dr. med. R. E. Baier - durchgeführt.

Herrn Privatdozent Dr. Gerth bin ich für die mannigfaltigen Anregungen und Ratschläge zu vielem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 17. September 1943 wurde ich als viertes Kind des Lehrers Willi Baur und der Brigitte geb. Schiedt in Freudenstadt geboren.

Nach vier Grundschuljahren in Kusterdingen besuchte ich bis zum Abitur 1964 das Wildermuthgymnasium in Tübingen.

Im Sommersemester 1964 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Tübingen, das ich am 5. Februar 1970 mit dem Staatsexamen abschloß.

Tübingen, den 23. Februar 1970

Ulrike Baur